

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/022574 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07H 21/00**

(72) Erfinder; und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009756

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRUPP, Guido [DE/DE]; Rosenstr. 3, 24622 Gnutz (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
2. September 2003 (02.09.2003)

(74) Anwälte: MENGES VON, A. usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

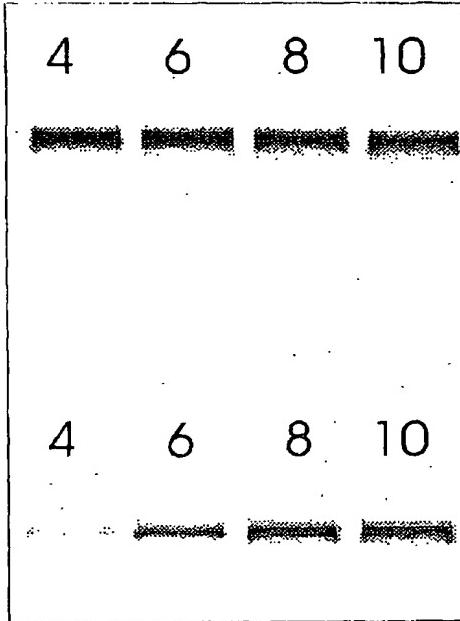
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

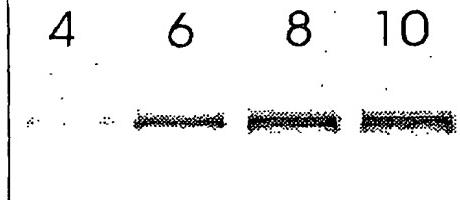
(54) Title: IMPROVED METHODS FOR THE SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERBESSERTE VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON NUKLEINSÄUREN

Mn<sup>2+</sup>(mM)



Mg<sup>2+</sup>(mM)



(57) Abstract: The invention relates to a method for the synthesis of nucleic acids, wherein a polymerase, a nucleic acid which can act as a matrix for the polymerase, NTPs and Mn<sup>2+</sup> are incubated in certain conditions which enable the synthesis of a nucleic acid strand. Said method is characterised in that the conditions have a mol ratio of Mn<sup>2+</sup>/NTP which is not greater than 0.7.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

---

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei dem man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn<sup>2+</sup> unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die Bedingungen ein Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

### Verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei denen man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und  $Mn^{2+}$  unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, wobei die Bedingungen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein Molverhältnis von  $Mn^{2+}/NTP$  von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Herstellung von RNA, bei denen eine DNA als Matrize verwendet wird und eine Amplifikationsrate von mindestens 1000-fach erzielt wird. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Kits, die für die Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren notwendigen Bestandteile umfassen.

Die Vermehrung von Nukleinsäuren *in vitro* ist für eine Vielzahl molekularbiologischer Verfahren, beispielsweise für die Klonierung, Sequenzanalyse, *in vitro* Expression, etc. erforderlich. Dementsprechend sind Verfahren entwickelt worden, mittels derer

- 2 -

Nukleinsäuren in vitro synthetisch hergestellt werden können. Die Verfahren lassen sich dabei im Allgemeinen durch das Reaktionsprodukt, DNA oder RNA, unterscheiden.

5 Die in vitro Transkription ist ein Verfahren zur Synthese von RNA üblicherweise ausgehend von einer doppelsträngigen DNA-Matrize. Dabei werden isolierte Bestandteile der zellulären Transkription (RNA-Polymerase und NTPs) für eine enzymatische Reaktion im Reagenzglas genutzt. Man geht dabei davon aus, dass das Substrat  
10 für die Synthesereaktion ein Komplex aus  $Mg^{2+}$  und NTP ist.  $Mg^{2+}$  ist somit ein wichtiger Bestandteil der Reaktion und wird üblicherweise im Vergleich zu der NTP-Konzentration in einem Überschuß zugegeben (Milligan und Uhlenbeck, Methods in Enzymology, Vol. 180 (1989), 51-62; und Wyatt et al., Biotechniques,  
15 Voll. 11 (1991), 764-769).

Zur Optimierung der Amplifikationsrate bei der in vitro Transkription schlägt die US 5,256,555 beispielsweise vor, die Nukleotide in einer Konzentration von insgesamt mehr als 16 mM  
20 in die Reaktion einzusetzen. Gleichzeitig soll das für die Reaktion notwendige  $Mg^{2+}$  in einer Konzentration eingesetzt werden, die nicht mehr als 10 % oberhalb der Konzentration der Summe aller Nukleotide beträgt. Ferner soll anorganische Pyrophosphatase in der Reaktionsmischung vorliegen.  
25

Das bekannteste Verfahren zur Synthese von DNA ist die Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase chain reaction" oder PCR), welche Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis entwickelt wurde (vgl. Saiki et al., Science, Vol. 230 (1985), 1350-1354; und EP 201 184).  
30

Bei der PCR-Reaktion lagern sich Einzelstrang-Primer (Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von üblicherweise 12 bis 24 Nukleotiden) an eine komplementäre, einzelsträngige DNA-Sequenz an. Die Primer werden mittels einer DNA-Polymerase und den  
35 Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs, nämlich dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu einem Doppelstrang verlängert. Der Doppelstrang wird durch Hitzeeinwirkung in Einzelstränge aufgetrennt. Die

- 3 -

Temperatur wird so weit gesenkt, dass sich erneut Einzelstrang-Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern. Die Primer werden durch die DNA-Polymerase erneut zu einem Zweitstrang elongiert.

- 5 Bei Wiederholung der obigen Schritte ist eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs-DNA-Stränge möglich, da die Reaktionsbedingungen so gewählt werden können, dass aus nahezu jedem DNA-Einzelstrang bei jedem Reaktionsdurchlauf ein Doppelstrang gebildet wird, der nachfolgend wieder in zwei Einzelstränge  
10 aufgespalten wird, welche wiederum als Matrize für weitere Stränge dienen.

Sofern vor diesem Verfahren eine reverse Transkription durchgeführt wird, bei der mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase  
15 ein DNA-Einzelstrang (die sogenannte cDNA) aus einer mRNA gebildet wird, kann die PCR-Reaktion auch unmittelbar auf die Vermehrung von Nukleinsäuren ausgehend von einer RNA-Sequenz anwendbar (vgl. EP 201 184).

- 20 Zu den genannten Reaktions-Grundschemata wurden eine Vielzahl von Alternativen entwickelt, die sich in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials (RNA, DNA, Einzelstränge, Doppelstränge) und des Reaktionsproduktes (Vermehrung spezifischer RNA- oder DNA-Sequenzen in einer Probe oder Vermehrung aller Sequenzen)  
25 voneinander unterscheiden.

Die DE 101 43 106.6 und DE 102 24 200.3 beschreiben beide Verfahren zur Vermehrung von Ribonukleinsäuren, welche eine Kombination aus einzelnen Schritten der PCR-Reaktion und einer  
30 Transkription umfassen.

Trotz der beschriebenen Fortschritte besteht nach wie vor ein Bedürfnis an verbesserten Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, insbesondere an Verfahren, die eine hohe Syntheseleistung  
35 und -ausbeute bei einem geringen Verbrauch der Chemikalien ermöglichen.

- 4 -

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren gelöst, bei denen man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn<sup>2+</sup> unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, wobei die Bedingungen dadurch gekennzeichnet sind, dass diese ein Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Erfindungsgemäß wurde somit überraschenderweise festgestellt, dass eine deutlich verbesserte Syntheserate der Polymerase bereits durch die Auswahl des genannten Molverhältnisses von Mn<sup>2+</sup>/NTP erzielt werden kann. Gleichzeitig werden durch die geringere Konzentration der einzusetzenden NTPs Kosten gespart. Eine hohe Amplifikationsrate lässt sich somit auf einfache und kostengünstige Art und Weise erzielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfundung wird der Begriff "Molverhältnis Mn<sup>2+</sup>/NTP" verwendet, um den Quotienten der molaren Konzentration des Mn<sup>2+</sup> im Verhältnis zur molaren Konzentration aller NTPs als Zahl darzustellen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfundungsgemäßen Verfahren werden die Bedingungen für die Synthese des Nukleinsäurestranges so gewählt, dass das Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von 0,2 bis 0,6, vorzugsweise von 0,3 bis 0,5 beträgt.

Bei Verwendung der erfundungsgemäßen Molverhältnisse beträgt die Gesamtkonzentration der NTPs vorzugsweise 4 bis 24mM; bei Verwendung vier verschiedener NTPs somit je 1 bis 6mM.

Daraus ergibt sich für Mn<sup>2+</sup> ein bevorzugter Konzentrationsbereich von 0,8 mM (Molverhältnis von 0,2 bei Konzentration der NTPs von 4mM) bis 14,4 mM (Molverhältnis von 0,6 bei Konzentration der NTPs von 24mM).

Als Polymerase kann in den erfundungsgemäßen Verfahren eine beliebige Polymerase eingesetzt werden, wobei die Verwendung von

- 5 -

RNA-Polymerasen, insbesondere von DNA-abhängigen RNA-Polymerase, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigen, die einen Promotor enthält, für alle Ausführungsformen der Erfindung besonders bevorzugt ist. Es kann sich somit beispielsweise um eine T7 RNA-Polymerase, eine T3 RNA-Polymerase, oder eine SP6 RNA-Polymerase handeln.

Bei der RNA-Polymerase kann es sich um eine RNA-abhängige oder eine DNA-abhängige Polymerase handeln. Die meisten der natürlicherweise DNA-abhängigen RNA-Polymerasen können auch RNA als Matrize erkennen, wenn eine geeignete Struktur vorliegt (vgl. Konarska, M.M. und Sharp, P.A., Cell Vol. 57 (1989), 423-431; und Konarska, M.M. und Sharp, P.A., Cell Vol. 63 (1990), 609-618).

Die Polymerase und die Nukleinsäure, die als Matrize dient, müssen zueinander passen. Die Nukleinsäure, die als Matrize für eine RNA-Polymerase dienen kann, muss beispielsweise Erkennungssequenzen oder Erkennungsstrukturen aufweisen, welche der RNA-Polymerase den Synthesestart ermöglichen. Vorzugsweise wird DNA als Matrize für die RNA-Polymerase eingesetzt. Entsprechende DNA kann eine Promotorregion enthalten, welche von der RNA-Polymerase erkannt und für den Synthesestart genutzt werden kann. Alternativ dazu kann die DNA eine Erkennungsstruktur ausbilden, welche es der RNA-Polymerase ermöglicht, die Synthese zu initiieren. Entsprechende Erkennungsstrukturen werden beispielsweise in Krupp (Nucleic Acids Res. Vol. 17 (1989), 3023-3036) und in Kuhn et al. (Nature Vol. 344 (1990), 559-562) beschrieben.

Da die erfindungsgemäßen Verfahren eine besonders hohe Amplifikationsrate ermöglichen, kann die Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase eingesetzt wird, in sehr geringer Konzentration vorliegen. Die Matrize kann beispielsweise in Form von DNA oder mRNA in einer Menge von mindestens 0,1 picogramm, bzw. 0,2 attomol in einem Ansatz von 20 $\mu$ l, somit einer Konzentration von mindestens 10 femtomolar eingesetzt werden.

- 6 -

Der Reaktionsansatz muss NTPs enthalten, wobei bei Verwendung einer RNA-Polymerase üblicherweise ATP, UTP, CTP und GTP eingesetzt werden. Bei einer im Stand der Technik üblichen Transkription werden alle hier genannten NTPs in einem Reaktions-  
5 ansatz eingesetzt. Es kann jedoch auch wünschenswert oder vorteilhaft sein, lediglich eines oder einige der NTPs einzusetzen.

Alternativ oder zusätzlich zu den NTPs können bei Durchführung  
10 des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der RNA- oder DNA-Polymerase ferner dNTPs eingesetzt werden. Dieses Vorgehen weist den besonderen Vorteil auf, dass das Transkript vollständig oder teilweise DNA-Eigenschaften erhält, d.h. es wird Nuklease-  
resistent und bietet eine bessere Matrize für die RNA-Polymerase.  
15 Als dNTPs werden üblicherweise dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP eingesetzt.

Alle oder einige der NTPs und/oder der dNTPs können als modifizierte Verbindung oder Derivate vorliegen. Im Stand der Technik  
20 übliche Derivatisierungen umfassen die Kopplung von Biotin oder eines Floureszenzmarkers, welche beispielsweise den Nachweis der Syntheseprodukte vereinfachen können.

Die Reaktionszeit und weiteren Reaktionsbedingungen (Temperatur,  
25 pH-Wert, etc.) können vom Fachmann in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase und der zu erzielenden Amplifikationsrate einfach gewählt werden. Die Inkubationszeit kann beispielsweise von 1 bis 24 Stunden, vorzugsweise von 4 bis 16 Stunden betragen. Bei Verwendung der T7-RNA-Polymerase bietet es sich an, die  
30 Reaktion in dem Bereich von 30°C bis 45°C durchzuführen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine überraschende Verbesserung der Amplifikationsrate. Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung wird das Verhältnis der Menge synthetisch hergestellter  
35 Nukleinsäuren zu der Menge der ursprünglich vorliegenden Matrize als Amplifikationsrate bezeichnet. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine Amplifikationsrate von mindestens 1000, vor-

- 7 -

zugsweise mindestens 2000. Bei optimalen Reaktionsbedingungen wurde sogar eine Amplifikationsrate von 2500 erzielt.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können für eine Vielzahl von  
5 Zwecken zum Einsatz gelangen. Die verbesserten Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäuren können beispielsweise in den in DE 101 43 106.6 und DE 102 24 200.3 beschriebenen Verfahren zur Vermehrung von Ribonukleinsäuren eingesetzt werden. Die mittels  
10 der erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Nukleinsäuren können als Sonden an einen Chip gebunden werden. Die Verfahren können für die *in vitro* Transkription, für die Untersuchung von Wechselwirkungen mit Nukleinsäurebindungs faktoren, als Aptamere zur spezifischen Bindung von Molekülen, als Ribozyme, etc.  
eingesetzt werden.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich Kits zur Synthese von Nukleinsäuren, die in einem oder mehreren Behältern eine Polymerase, NTPs, dNTPs und/oder deren Derivate (beispielsweise biotinylierte oder mit Floureszenzmarkern gekoppelte NTPs oder  
20 dNTPs) und Mn<sup>2+</sup> umfassen. Bei der Polymerase handelt es sich vorzugsweise um eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigt, die einen Promotor enthält. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der RNA-Polymerase um die T7 RNA-  
25 Polymerase, T3 RNA-Polymerase, oder SP6 RNA-Polymerase.

Entsprechende Kits enthalten ferner vorzugsweise eine Anweisung zur Durchführung eines der erfindungsgemäßen Verfahren. In entsprechenden Anweisungen oder Handbüchern wird genau beschrieben, in welcher Menge die einzelnen Bestandteile der Reaktion miteinander vermischt werden müssen, um optimale Syntheseleistungen zu erhalten.

- 8 -

### Kurze Beschreibung der Figuren

- Fig. 1 In vitro Transkription unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>; Bestimmung des optimalen Verhältnisses Mn<sup>2+</sup>/NTPs und Vergleich mit Mg<sup>2+</sup>.  
5
- Fig. 2 Bestimmung der optimalen NTP-Konzentration bei verschiedenen Mn/NTP-Verhältnissen.
- 10 Fig. 3 Bestimmung der Amplifikationsrate

### Beispiel 1

- 15 In diesem Beispiel wurde die Transkriptionsleistung der RNA-Polymerase in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von Mn<sup>2+</sup> sowie Mg<sup>2+</sup> ermittelt.
- 20 Dafür wurde in einem Reaktionsansatz 20 µl, 40 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM DTT, 2 mM Spermidin, 0,01% Triton X-100, 10 ng Nukleinsäure Matrize (Plasmid pTRI-Xef), 10 U RNasin- (RNase-Inhibitor), 40 U T7 RNA-Polymerase, 4 mM NTPs (jedes; ergibt gesamt 16 mM) und Mn<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup> in einer Konzentration von 4 mM 25 bis 10 mM zusammen pipettiert und für 16 Stunden inkubiert.
- Aliquote Teilmengen von 5 µl wurden auf einem 1%igen Agarosegel elekrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid photographiert. Das Ergebnis ist in Fig. 1 dargestellt.  
30 In Abhängigkeit der Konzentration des Mn<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup> ergibt sich ein Verhältnis aus Mn<sup>2+</sup>/NTPs von 0,25 bis 0,625.
- Fig. 1 zeigt eindeutig, dass die Gegenwart von Mn<sup>2+</sup> im Vergleich zu der Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> in allen Versuchsansätzen eine bessere 35 Amplifikationsrate erzielte.

- 9 -

### Beispiel 2

Das Ziel dieses Beispiels bestand darin, die optimale NTP-Konzentration in Abhängigkeit des Mn/NTP-Verhältnisses zu  
5 ermitteln.

Zu diesem Zweck wurden Reihen von Versuchsansätzen für die in vitro-Transkription wie in Beispiel 1 erstellt. Die Konzentration der einzelnen NTPs betrug dabei von 2 mM bis 10 mM und die  
10 Konzentration des MnCl<sub>2</sub> betrug von 2,4 mM bis 24 mM. Daraus ergeben sich Verhältnisse von Mn/NTP von 0,3 bis 0,6.

Die durch die Transkription erhaltene Menge an Transkript (in ng) wurde durch Ethidiumbromidfärbung des Gels und einer RNA-  
15 Verdünnungsreihe als Standard im Gel bestimmt.

Das Ergebnis ist in Fig. 2 zusammengefasst und zeigt, daß bereits bei einer Konzentration von 4 mM je NTP (gesamt also 16 mM) eine maximale Syntheserate erbrachten. Die besten Ergebnisse wurden  
20 bei der Kombination von 4 mM je NTP und 6,4 mM MnCl<sub>2</sub> erhalten (entspricht einem Verhältnis von 0,4).

### Beispiel 3

25 In diesem Beispiel wurde die Amplifikationsrate der in vitro-Transkription in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Dafür wurde zunächst eine in vitro-Transkriptionsreaktion wie in Beispiel 1 beschrieben erstellt, wobei 4,8 mM MnCl<sub>2</sub> und 4 mM NTP (Summe  
30 16 mM) eingesetzt wurden (entspricht einem Verhältnis von 0,3).

Zu den in Fig. 3 genannten Zeiten wurden je 5 µl entnommen und auf einem 1 % nativen Agarosegel analysiert. Die Ergebnisse werden in Fig. 3 gezeigt und lassen erkennen, dass in allen  
35 Reaktionsansätzen ein Amplifikationsfaktor von mehr als 1500 erzielt wurde.

- 10 -

Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei dem man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und  $Mn^{2+}$  unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, dadurch gekennzeichnet, dass die Bedingungen ein Molverhältnis von  $Mn^{2+}/NTP$  von nicht mehr als 0,7 umfassen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase eine RNA-Polymerase ist, vorzugsweise eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigen, die einen Promotor enthält.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis von  $Mn^{2+}/NTP$  von 0,2 bis 0,6 beträgt, vorzugsweise 0,3 bis 0,5.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Gesamtkonzentration der NTPs 4 bis 24mM beträgt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des  $Mn^{2+}$  mindestens 3mM, vorzugsweise mindestens 3,5mM oder mindestens 4mM beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Konzentration des  $Mn^{2+}$  von 4 bis 17 mM beträgt.
7. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem man als Polymerase eine T7 RNA-Polymerase, eine T3 RNA-Polymerase, oder eine SP6 RNA-Polymerase einsetzt.

- 11 -

8. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man als Nukleinsäure, die als Matrize für die RNA-Polymerase dienen kann, DNA oder RNA einsetzt.
9. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Nukleinsäure, die als Matrize für die RNA-Polymerase dienen kann, RNA oder DNA in einer Menge von mindestens 0,1 picogramm (bzw. 0,2 attomol) oder einer Konzentration von mindestens 10 femtomolar vorliegt.
10. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ATP, UTP, CTP und/oder GTP als NTPs eingesetzt werden.
11. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ferner dNTPs eingesetzt werden.
12. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP als dNTPs eingesetzt werden.
13. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die NTPs oder dNTPs als Derivate, beispielsweise als biotinylierte oder mit einem Floureszenzmarker-gekoppelte Derivate, eingesetzt werden.
14. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem eine Amplifikationsrate von mindestens 1000-fach, vorzugsweise mindestens 2000-fach, erzielt wird.
15. Kit zur Synthese von Nukleinsäuren, das in einem Behälter oder in mehreren getrennten Behältern eine Polymerase, NTPs und Mn<sup>2+</sup> umfasst.
16. Kit gemäß Anspruch 15, in dem die RNA-Polymerase eine DNA-abhängige RNA-Polymerase ist, welche für die Synthese von RNA eine DNA als Matrize benötigt, die einen Promotor enthält, wobei es sich vorzugsweise bei der RNA-Polymerase

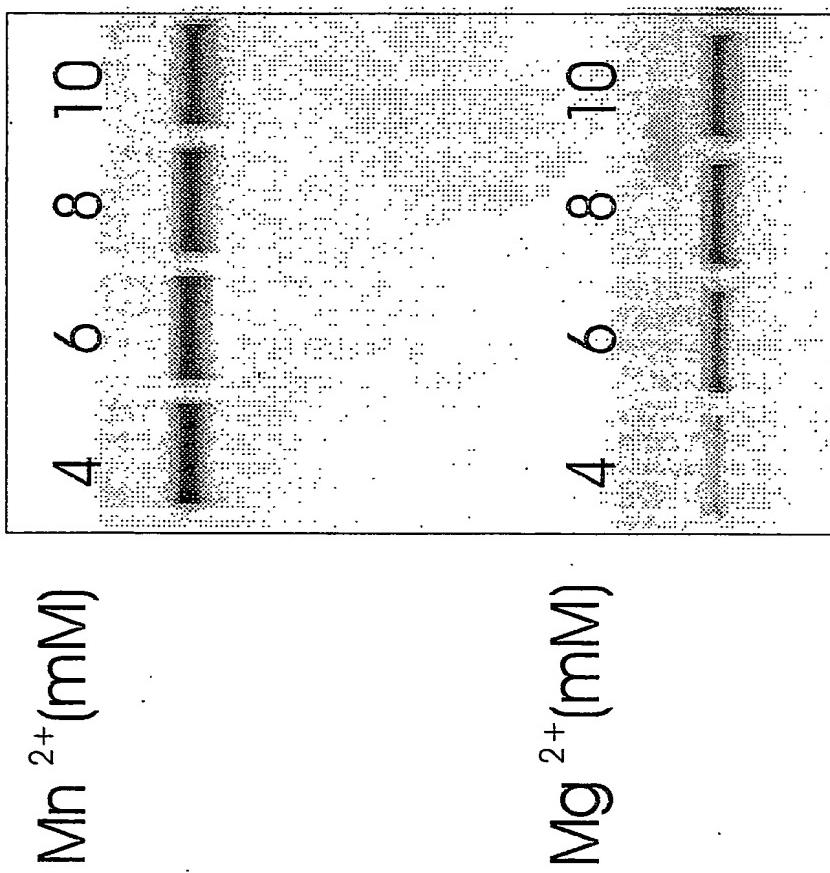
- 12 -

um die T7 RNA-Polymerase, T3 RNA-Polymerase, oder SP6 RNA-Polymerase handelt.

17. Kit gemäß Anspruch 15 oder 16, in dem ATP, UTP, CTP und/oder GTP als NTPs vorliegen.
18. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, in dem ferner dNTPs vorliegen.
19. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18, in dem dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP als dNTPs vorliegen.
20. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19, in dem die NTPs oder dNTPs als Derivate, beispielsweise als biotinylierte oder mit einem Floureszenzmarker-gekoppelte Derivate, vorliegen.
21. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, das ferner eine Anweisung zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 umfasst.

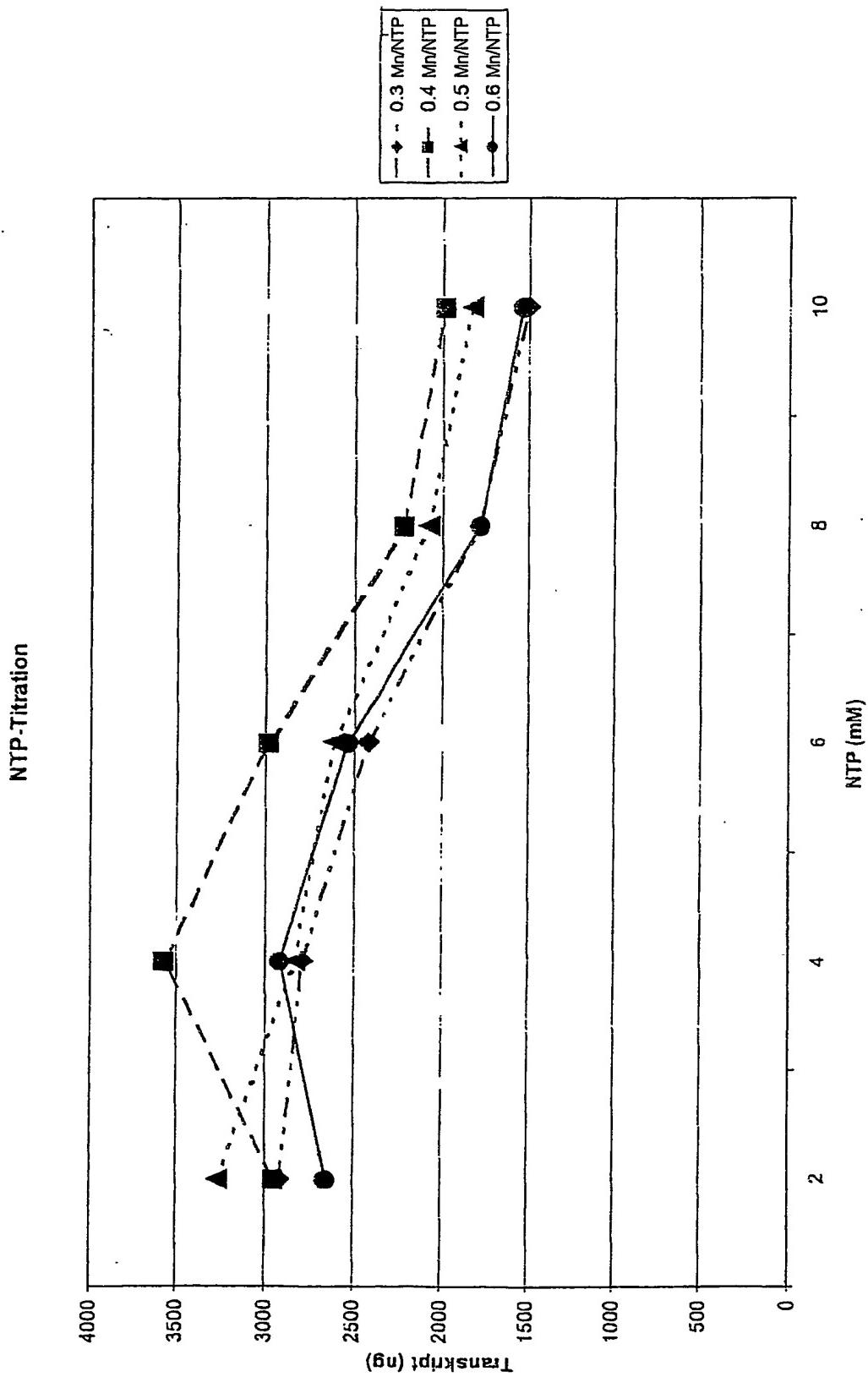
1/3

Figure 1



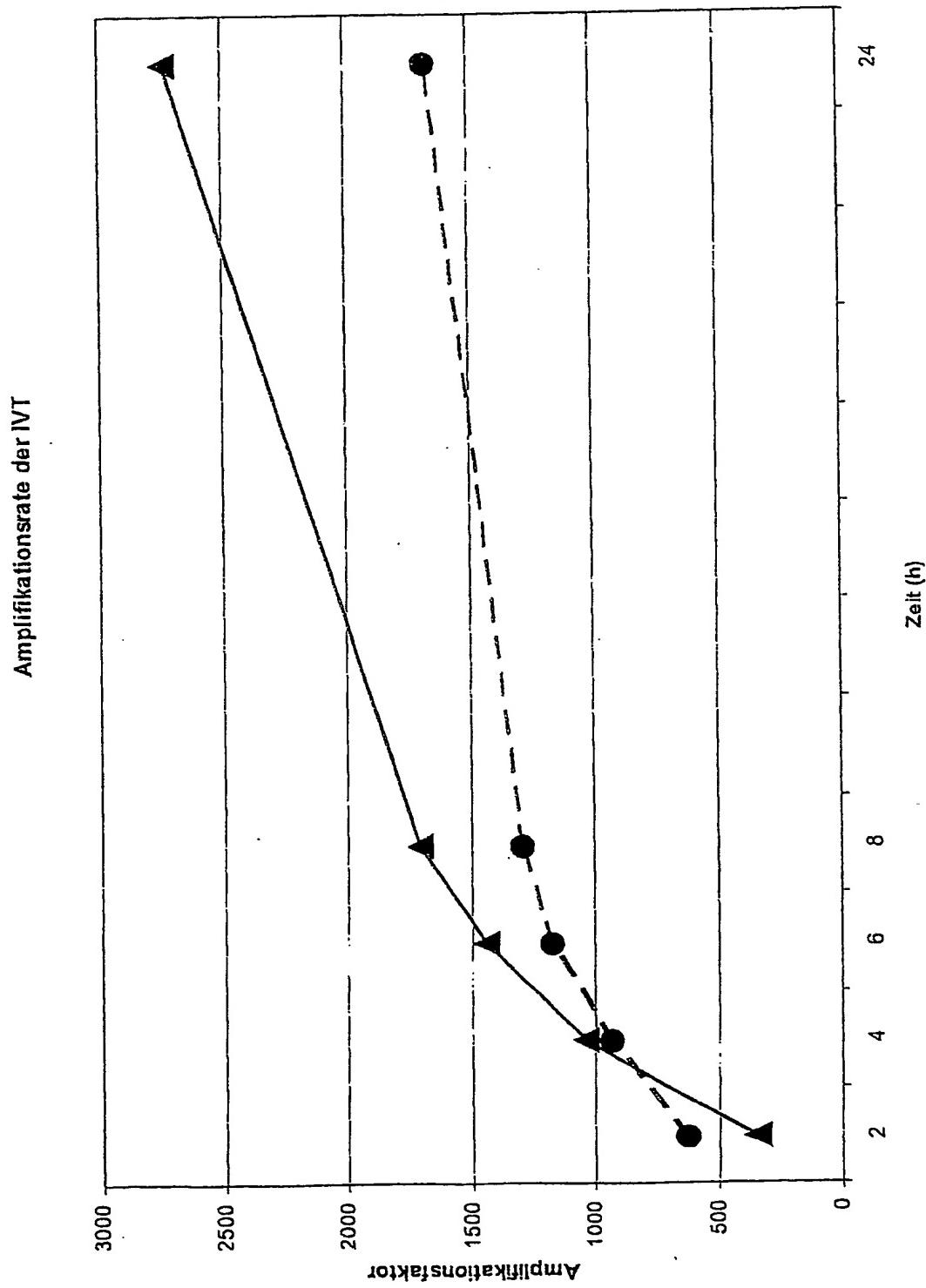
2/3

Figur 2



3 / 3

Figur 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/09756

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 08800 A (SISKA DIAGNOSTICS INC) 29 May 1992 (1992-05-29) page 36, line 31 -page 39, line 4 page 46, line 17 - line 32 example 6 claims 9,10,28,29,57,58 --- -/- ---	1-4,7-21

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

2 December 2003

04/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP/09756

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PEZO V ET AL: "Hypermutagenic <i>in vitro</i> transcription employing biased NTP pools and manganese cations" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 186, no. 1, 20 February 1997 (1997-02-20), pages 67-72, XP004054881 ISSN: 0378-1119 page 68, left-hand column, paragraph 1 figure 1 table 1 ---	1-4,7-21
X	US 6 090 589 A (EKENBERG STEVEN J ET AL) 18 July 2000 (2000-07-18)  example 13 ---	1-4, 8-10, 13-17, 20,21
X	US 5 407 800 A (GELFAND DAVID H ET AL) 18 April 1995 (1995-04-18)  column 15, line 17 - line 35 column 17, line 50 - line 68 ---	1,3,8,9, 11-15, 18-21
X	US 5 561 058 A (SIGUA CHRISTOPHER L ET AL) 1 October 1996 (1996-10-01)  column 14, line 17 - line 34 column 21, line 34 -column 22, line 11 column 27, line 1 - line 3 example 14 ---	1,3,8,9, 11-15, 18-21
A	G. LÖFFLER AND P.E. PETRIDES: "Biochemie und Pathobiochemie" 1998 , SPRINGER , BERLIN HEIDELBERG NEW YORK XP002263485 v.a.: S.150, Sp.1 und Abb. 7.1 page 150 -page 154 -----	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 93/09756

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9208800	A	29-05-1992	AU 9131591 A CA 2096013 A1 EP 0572417 A1 FI 932144 A HU 69772 A2 IE 913930 A1 IL 100040 A JP 6502767 T NO 931709 A NZ 240574 A PT 99500 A WO 9208800 A1 ZA 9108965 A	11-06-1992 14-05-1992 08-12-1993 12-05-1993 28-09-1995 17-06-1992 31-12-1995 31-03-1994 12-07-1993 26-10-1994 30-10-1992 29-05-1992 26-08-1992
US 6090589	A	18-07-2000	US 2002192677 A1 US 6369207 B1 AT 159763 T AU 694199 B2 AU 2022295 A AU 8935798 A AU 9165091 A CA 2076750 A1 DE 69128077 D1 DE 69128077 T2 DK 519053 T3 EP 0519053 A1 ES 2108748 T3 JP 5505111 T JP 3183510 B2 KR 231383 B1 WO 9212261 A1	19-12-2002 09-04-2002 15-11-1997 16-07-1998 21-09-1995 07-01-1999 17-08-1992 01-07-1992 04-12-1997 26-02-1998 20-07-1998 23-12-1992 01-01-1998 05-08-1993 09-07-2001 15-11-1999 23-07-1992
US 5407800	A	18-04-1995	US 5322770 A US 4889818 A AT 151112 T AU 656315 B2 AU 7244491 A CA 2071213 A1 DE 69030386 D1 DE 69030386 T2 DK 506889 T3 EP 0506889 A1 ES 2100945 T3 GR 3023862 T3 JP 2968585 B2 JP 5505105 T US 5310652 A WO 9109944 A2 US 5618703 A US 5641864 A US 5693517 A US 5561058 A US 5795762 A US 5466591 A AT 169337 T AU 681387 B2 AU 6329694 A AU 646430 B2	21-06-1994 26-12-1989 15-04-1997 02-02-1995 24-07-1991 23-06-1991 07-05-1997 09-10-1997 22-09-1997 07-10-1992 01-07-1997 30-09-1997 25-10-1999 05-08-1993 10-05-1994 11-07-1991 08-04-1997 24-06-1997 02-12-1997 01-10-1996 18-08-1998 14-11-1995 15-08-1998 28-08-1997 01-09-1994 24-02-1994

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/EP 00/09756

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5407800	A	AU 7176491 A CA 2071196 A1 DE 69032543 D1 DE 69032543 T2 DK 506825 T3 EP 0506825 A1 ES 2121777 T3 JP 2790448 B2 JP 9224682 A JP 2774192 B2 JP 5504887 T SG 46627 A1 WO 9109950 A1 US 5618711 A US 5789224 A AT 135741 T AU 3062989 A AU 632857 B2 AU 6391090 A DE 68926038 D1 DE 68926038 T2 DE 395736 T1 EP 0395736 A1 HK 166096 A	24-07-1991 23-06-1991 10-09-1998 15-04-1999 03-05-1999 07-10-1992 16-12-1998 27-08-1998 02-09-1997 09-07-1998 29-07-1993 20-02-1998 11-07-1991 08-04-1997 04-08-1998 15-04-1996 11-08-1989 14-01-1993 10-01-1991 25-04-1996 17-10-1996 03-09-1992 07-11-1990 13-09-1996
US 5561058	A 01-10-1996	US 5693517 A US 5310652 A US 5418149 A US 5322770 A US 4889818 A AT 205259 T AU 675318 B2 AU 6594694 A CA 2127188 A1 DE 69428167 D1 DE 69428167 T2 DK 632134 T3 EP 0632134 A2 ES 2161731 T3 JP 3097893 B2 JP 7059599 A US 5618703 A US 5641864 A US 5618711 A US 5789224 A AT 176002 T AU 665338 B2 AU 8532791 A CA 2087724 A1 DE 69130800 D1 DE 69130800 T2 DK 540693 T3 EP 0540693 A1 ES 2128323 T3 GR 3029987 T3 JP 3392863 B2 JP 6501612 T WO 9201814 A2	02-12-1997 10-05-1994 23-05-1995 21-06-1994 26-12-1989 15-09-2001 30-01-1997 12-01-1995 02-01-1995 11-10-2001 29-05-2002 03-12-2001 04-01-1995 16-12-2001 10-10-2000 07-03-1995 08-04-1997 24-06-1997 08-04-1997 04-08-1998 15-02-1999 04-01-1996 18-02-1992 25-01-1992 04-03-1999 16-09-1999 13-09-1999 12-05-1993 16-05-1999 30-07-1999 31-03-2003 24-02-1994 06-02-1992

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP98/09756

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5561058	A	US 5795762 A	18-08-1998
		US 5466591 A	14-11-1995
		AT 151112 T	15-04-1997
		AU 656315 B2	02-02-1995
		AU 7244491 A	24-07-1991
		CA 2071213 A1	23-06-1991
		DE 69030386 D1	07-05-1997
		DE 69030386 T2	09-10-1997
		DK 506889 T3	22-09-1997
		EP 0506889 A1	07-10-1992
		ES 2100945 T3	01-07-1997
		GR 3023862 T3	30-09-1997
		JP 2968585 B2	25-10-1999
		JP 5505105 T	05-08-1993
		US 5407800 A	18-04-1995
		WO 9109944 A2	11-07-1991
		AT 169337 T	15-08-1998

# INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/09756

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 08800 A (SISKA DIAGNOSTICS INC) 29. Mai 1992 (1992-05-29) Seite 36, Zeile 31 -Seite 39, Zeile 4 Seite 46, Zeile 17 - Zeile 32 Beispiel 6 Ansprüche 9,10,28,29,57,58 --- -/--	1-4,7-21

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifeilhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
2. Dezember 2003	04/03/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Ulbrecht, M

## INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EU/09756

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PEZO V ET AL: "Hypermutagenic <i>in vitro</i> transcription employing biased NTP pools and manganese cations" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 186, Nr. 1, 20. Februar 1997 (1997-02-20), Seiten 67-72, XP004054881 ISSN: 0378-1119 Seite 68, linke Spalte, Absatz 1 Abbildung 1 Tabelle 1 ---	1-4, 7-21
X	US 6 090 589 A (EKENBERG STEVEN J ET AL) 18. Juli 2000 (2000-07-18)  Beispiel 13 ---	1-4, 8-10, 13-17, 20, 21
X	US 5 407 800 A (GELFAND DAVID H ET AL) 18. April 1995 (1995-04-18)  Spalte 15, Zeile 17 - Zeile 35 Spalte 17, Zeile 50 - Zeile 68 ---	1, 3, 8, 9, 11-15, 18-21
X	US 5 561 058 A (SIGUA CHRISTOPHER L ET AL) 1. Oktober 1996 (1996-10-01)  Spalte 14, Zeile 17 - Zeile 34 Spalte 21, Zeile 34 - Spalte 22, Zeile 11 Spalte 27, Zeile 1 - Zeile 3 Beispiel 14 ---	1, 3, 8, 9, 11-15, 18-21
A	G. LÖFFLER AND P.E. PETRIDES: "Biochemie und Pathobiochemie" 1998, SPRINGER, BERLIN HEIDELBERG NEW YORK XP002263485 v.a.: S.150, Sp.1 und Abb. 7.1 Seite 150 - Seite 154 -----	1-21

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu der Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 09756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9208800	A	29-05-1992	AU CA EP FI HU IE IL JP NO NZ PT WO ZA	9131591 A 2096013 A1 0572417 A1 932144 A 69772 A2 913930 A1 100040 A 6502767 T 931709 A 240574 A 99500 A 9208800 A1 9108965 A	11-06-1992 14-05-1992 08-12-1993 12-05-1993 28-09-1995 17-06-1992 31-12-1995 31-03-1994 12-07-1993 26-10-1994 30-10-1992 29-05-1992 26-08-1992
US 6090589	A	18-07-2000	US US AT AU AU AU AU AU AU CA DE DE DK EP ES JP JP KR WO	2002192677 A1 6369207 B1 159763 T 694199 B2 2022295 A 8935798 A 9165091 A 2076750 A1 69128077 D1 69128077 T2 519053 T3 0519053 A1 2108748 T3 5505111 T 3183510 B2 231383 B1 9212261 A1	19-12-2002 09-04-2002 15-11-1997 16-07-1998 21-09-1995 07-01-1999 17-08-1992 01-07-1992 04-12-1997 26-02-1998 20-07-1998 23-12-1992 01-01-1998 05-08-1993 09-07-2001 15-11-1999 23-07-1992
US 5407800	A	18-04-1995	US US AT AU AU CA DE DE DK EP ES GR JP JP US WO US US US US US AT AU AU AU	5322770 A 4889818 A 151112 T 656315 B2 7244491 A 2071213 A1 69030386 D1 69030386 T2 506889 T3 0506889 A1 2100945 T3 3023862 T3 2968585 B2 5505105 T 5310652 A 9109944 A2 5618703 A 5641864 A 5693517 A 5561058 A 5795762 A 5466591 A 169337 T 681387 B2 6329694 A 646430 B2	21-06-1994 26-12-1989 15-04-1997 02-02-1995 24-07-1991 23-06-1991 07-05-1997 09-10-1997 22-09-1997 07-10-1992 01-07-1997 30-09-1997 25-10-1999 05-08-1993 10-05-1994 11-07-1991 08-04-1997 24-06-1997 02-12-1997 01-10-1996 18-08-1998 14-11-1995 15-08-1998 28-08-1997 01-09-1994 24-02-1994

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu der Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP/09756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5407800	A	AU 7176491 A CA 2071196 A1 DE 69032543 D1 DE 69032543 T2 DK 506825 T3 EP 0506825 A1 ES 2121777 T3 JP 2790448 B2 JP 9224682 A JP 2774192 B2 JP 5504887 T SG 46627 A1 WO 9109950 A1 US 5618711 A US 5789224 A AT 135741 T AU 3062989 A AU 632857 B2 AU 6391090 A DE 68926038 D1 DE 68926038 T2 DE 395736 T1 EP 0395736 A1 HK 166096 A	24-07-1991 23-06-1991 10-09-1998 15-04-1999 03-05-1999 07-10-1992 16-12-1998 27-08-1998 02-09-1997 09-07-1998 29-07-1993 20-02-1998 11-07-1991 08-04-1997 04-08-1998 15-04-1996 11-08-1989 14-01-1993 10-01-1991 25-04-1996 17-10-1996 03-09-1992 07-11-1990 13-09-1996
US 5561058	A 01-10-1996	US 5693517 A US 5310652 A US 5418149 A US 5322770 A US 4889818 A AT 205259 T AU 675318 B2 AU 6594694 A CA 2127188 A1 DE 69428167 D1 DE 69428167 T2 DK 632134 T3 EP 0632134 A2 ES 2161731 T3 JP 3097893 B2 JP 7059599 A US 5618703 A US 5641864 A US 5618711 A US 5789224 A AT 176002 T AU 665338 B2 AU 8532791 A CA 2087724 A1 DE 69130800 D1 DE 69130800 T2 DK 540693 T3 EP 0540693 A1 ES 2128323 T3 GR 3029987 T3 JP 3392863 B2 JP 6501612 T WO 9201814 A2	02-12-1997 10-05-1994 23-05-1995 21-06-1994 26-12-1989 15-09-2001 30-01-1997 12-01-1995 02-01-1995 11-10-2001 29-05-2002 03-12-2001 04-01-1995 16-12-2001 10-10-2000 07-03-1995 08-04-1997 24-06-1997 08-04-1997 04-08-1998 15-02-1999 04-01-1996 18-02-1992 25-01-1992 04-03-1999 16-09-1999 13-09-1999 12-05-1993 16-05-1999 30-07-1999 31-03-2003 24-02-1994 06-02-1992

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die auf die oben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP/09756

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5561058	A	US 5795762 A	18-08-1998
		US 5466591 A	14-11-1995
		AT 151112 T	15-04-1997
		AU 656315 B2	02-02-1995
		AU 7244491 A	24-07-1991
		CA 2071213 A1	23-06-1991
		DE 69030386 D1	07-05-1997
		DE 69030386 T2	09-10-1997
		DK 506889 T3	22-09-1997
		EP 0506889 A1	07-10-1992
		ES 2100945 T3	01-07-1997
		GR 3023862 T3	30-09-1997
		JP 2968585 B2	25-10-1999
		JP 5505105 T	05-08-1993
		US 5407800 A	18-04-1995
		WO 9109944 A2	11-07-1991
		AT 169337 T	15-08-1998